

日 本 国 特 許
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載され
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 9 年 1 2 月 2 8 日

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 3 7 2 9 2 5 号

出 願 人
Applicant (s):

富士写真フイルム株式会社



2 0 0 0 年 1 0 月 6 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造

出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 8 1 2 5 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 P24684J

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 G01N 23/221

G01N 21/64

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡開成町宮台 7 9 8 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 秋本 泰造

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073184

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳田 征史

【選任した代理人】

【識別番号】 100090468

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐久間 剛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008969

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814441

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 試験片およびそれを用いた分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標識物質で標識付けられた検体と結合する検出体が多数配置固定された試験片であって、所定位置に該試験片に関する識別情報が配置されてなることを特徴とする試験片。

【請求項 2】 前記識別情報が前記標識物質またはこれに類似する標識物質からなることを特徴とする請求項 1 記載の試験片。

【請求項 3】 スポッタ装置またはインクジェットプリンタ装置を用いて前記識別情報が配置されてなることを特徴とする請求項 1 または 2 項記載の試験片。

【請求項 4】 検出体が多数配置固定された試験片に、標識物質で標識付けられた検体を接触させ、該検体と前記検出体を結合させる結合工程と、前記検体と結合した検出体に関する検出情報を取得する取得工程とを備えた検体分析方法において、

前記取得工程の前に、前記試験片の所定位置に該試験片に関する識別情報を付与する付与工程と、

前記識別情報を読み取る読取工程とをさらに有することを特徴とする検体分析方法。

【請求項 5】 前記識別情報が前記標識物質またはこれに類似する標識物質からなることを特徴とする請求項 4 記載の検体分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はマイクロアレイ、マクロアレイ、DNAチップ等の試験片を用いた分析方法、詳しくは、多種類の生体分子を検出体として基板上に配置固定しておき、これを標識物質（放射性同位体、蛍光色素等）で標識付けられた生体分子を含む検体とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした検出体を特定する試験片、およびこの試験片を用いた分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

実験医学シリーズ（株式会社羊土社出版）の第17巻（1999年）の1月号の61～65頁に、「マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析」と題する論文が掲載されており、そこにマイクロアレイを用いて遺伝子の発現解析を行う方法が詳細に説明されている。

【0003】

このマイクロアレイやマクロアレイ、DNAチップ等の試験片を用いた遺伝子発現解析技術は最近広く知られ実施されており、図8に示すように、メンブレン、ガラス、スライドガラス、シリコン基板等の基板40の表面に、多種類の生体分子（cDNA、オリゴDNA、その他のDNA、PNAあるいはEST等が現在多用されている）を検出体としてスポット装置等によりマトリクス状に配置固定した試験片を用いる。この試験片は、基板40の種類、サイズ、スポット数、スポットのサイズ、検出体（プローブ）および検体（ターゲット）の種類等に応じて、マクロアレイ、マイクロアレイ、DNAチップ等と称される。

【0004】

その一方において、放射性同位体あるいは蛍光色素などで標識付けられたcDNA、ゲノムDNA、mRNA等のRNA、dNTPあるいはPNA等の生体分子が検体として用意される。

【0005】

そしてマトリクス状に固定された検出体と放射性同位体などで標識付けられた検体とがハイブリダイゼーションされる。

【0006】

ここで相互にハイブリダイゼーション（結合）する生体分子が検出体および検体に含まれていれば、両生体分子が基板上でハイブリダイズし、ハイブリダイズした生体分子を有する検出体に、放射性同位体や蛍光色素などの標識物質が生体分子を介して固定される。一方、ハイブリダイズされなかった検出体には放射性同位体や蛍光色素などは固定されない。図8中の2重丸は、ハイブリダイズした検出体の基板上の存在位置で、放射性同位体や蛍光色素などの標識物質が固定さ

れた位置を模式的に示している。なお、図 8 は模式的説明であってマトリクス状に配置されたドットのの一つ一つが識別可能に示されているが、実際には微細ドットが高密度で配置されているため、肉眼では殆ど識別できない。

【0007】

そして試験片上のどこに放射性同位体または蛍光色素などの標識物質が存在しているかを検出することにより、その検出位置からハイブリダイズした検出体の基板上の存在位置が特定され、その存在位置からハイブリダイズした検出体の種類が特定される。また、これと同時にハイブリダイズした検体の量が検出される。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

このようにハイブリダイズした検出体の種類を特定するためには、放射性同位体や蛍光色素の検出位置に関する情報と試験片に配置固定した検出体の種類と位置に関する情報とを比較しなければならない。

【0009】

しかしながら、従来試験片に配置固定した検出体の種類と位置に関する情報は試験片を製作する際に使用されるスポット装置等に格納されていた。このため、放射性同位体や蛍光色素の検出位置に関する情報からハイブリダイズした検出体の種類を特定する際には、研究者等が手作業でこれらの情報をコンピュータに入力しなければならなかった。したがって、試験片に配置固定する検出体の種類を変えて多くの種類の試験片について実験を行った場合には、研究者が誤って違う種類の試験片の情報を入力する入力ミスが発生しやすく、また異なる種類の試験片について実験を行ってしまうおそれもあるため、試験片に配置固定した検出体の種類と位置に関する情報と検出した標識物質の位置に関する情報が対応しないという問題があった。

【0010】

本発明は、試験片に多数配置固定した検出体の種類と位置等に関する情報と検出した標識物質の位置に関する情報との対応が不一致となることを防止することができる試験片およびその試験片を用いた分析方法を提供することを目的とする

ものである。

【0011】

なお、本発明では、試験片の用途を遺伝子発現解析、塩基配列の決定、変異解析、多型解析など、遺伝子の解析に供するものに限定せず、さらに広く、何らかの反応により、基板にスポット状に固定配置された検出体に選択的に結合する検体の分析にも応用できるものとして、広く定義するものとする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明による試験片は、標識物質で標識付けられた検体と結合する検出体が多数配置固定された試験片であって、所定位置に該試験片に関する識別情報が配置されてなることを特徴とするものである。

【0013】

なお、前記識別情報が前記標識物質またはこれに類似する標識物質からなることが好ましい。

【0014】

本発明による試験片としては、マイクロアレイ、マクロアレイ、DNAチップ等、検出体を多数配置可能なものであればその種類を問わない。

【0015】

検出体としては、cDNA、オリゴDNA、その他のDNA、PNAあるいはEST等のアレイ法に用いられるものであればよく、その種類を問わない。すなわち、本発明による試験片に配置固定される検出体は生体分子に限らず、何らかの反応により、検体と選択的に結合するものであれば、多種多様のものであり得る。

【0016】

検体としては、cDNA、ゲノムDNA、mRNA等のRNA、dNTPあるいはPNA等の生体分子が通常用いられるが、これらは例示であってこれらに限られない。

【0017】

また、「所定位置」とは、検出体が配置固定される位置でなければどこでもよ

く、特に制限があるわけではない。

【0018】

また、「識別情報」とは、試験片を識別するための情報であり、少なくとも試験片に配置固定された検出体の種類や位置を特定するために必要となる情報であり、例えば試験片毎に付与された識別番号等であってもよい。また、識別情報には、試験片に使用した基板の種類、試験片を作成した作成日、通し番号、ロット番号、検出体の配置に関するフォーマット等の情報が含まれてもよい。また、検出体のみならず検体に関する情報を含むものであってもよい。識別情報は、試験片上の所定の位置に配置されるが、配置するスペースを小さくする観点から、コード化して配置することが好ましい。

【0019】

標識物質としては、放射性同位体や蛍光色素等が通常用いられるが、これらは例示であってこれらに限られない。

【0020】

なお、試験片に関する識別情報は、スポット装置を使用して試験片上に配置固定してもよいし、インクジェットプリンタ装置により試験片上に配置固定してもよい。

【0021】

本発明による検体分析方法は、検出体が多数配置固定された試験片に、標識物質で標識付けられた検体を接触させ、該検体と前記検出体を結合させる結合工程と、前記検体と結合した検出体に関する検出情報を取得する取得工程とを備えた検体分析方法において、

前記取得工程の前に、前記試験片の所定位置に該試験片に関する識別情報を付与する付与工程と、

前記識別情報を読み取る読取工程とをさらに有することを特徴とするものである。

【0022】

検体と検出体の「結合」の態様には、相補的な塩基配列の間に安定な2本鎖を形成するハイブリダイゼーションの他、例えば特異的結合によって結合するもの

等が含まれる。なお、検体と検出体が何らかの反応により結合する場合とは、例えば各種のアフィニティー（親和性）が考えられる。

【0023】

「検出情報」とは、検出体と検体とをハイブリダイゼーションさせた後に、ハイブリダイズした検出体に標識物質が固定されるが、この標識物質を検出することにより得られる、ハイブリダイズした検出体の存在位置を表す情報のことをいう。

【0024】

なお、本発明による検体分析方法においては、前記識別情報が前記標識物質またはこれに類似する標識物質からなることが好ましい。

【0025】

ここで、「類似する標識物質」とは、標識物質が放射性同位体の場合には、前記標識物質とは異なるものの、前記標識物質と同様の放射線を発する物質のことをいう。なお、標識物質が蛍光体の場合には、前記標識物質とは異なるものの、該標識物質に照射する励起光と同様の波長域の励起光の照射により、該標識物質と同様の波長域の蛍光を発する物質のことをいう。

【0026】

なお、前記試験片の所定位置に識別情報を配置する時点は、前記検出工程の前であればいつでもよく、例えば、試験片に検出体を配置固定する際に行ってもよいし、検出体と検体を結合させた後に行ってもよい。

【0027】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、試験片に関する識別情報が試験片に配置されているため、試験片上の標識物質を検出する際に、試験片に関する情報を検出するようにすれば、検出情報と識別情報とを対応させることができ、これにより検出情報と試験片に配置固定された検出体の種類や位置に関する情報との対応が不一致となることを防止できる。

【0028】

また、識別情報を標識物質またはこれに類似する標識物質からなるものとする

ことにより、試験片上の標識物質を検出する際に、同時に識別情報を検出することができるため、検出情報の取得工程と識別情報の読取工程とを同時に行うことができ、これにより余分な工程を増やすことなく処理を行うことができる。

【0029】

【発明の実施の形態】

本発明の一実施の形態に係るマイクロアレイを用いた生体分子分析方法について図1乃至7を用いて説明する。

【0030】

まずスポット装置を用いて基板（メンブレン）の上に多種類の生体分子（cDNA）をマトリクス状に配置する。すなわち、図1に示すように、メンブレン2の上に多種類の生体分子4がマトリクス状に配置されて試験片1が形成される。なお、メンブレン2上に配置されるcDNAをプローブ（検出体）とする。

【0031】

次に、試験片1の図2中20で示す位置に試験片1に関する識別情報を付与する。具体的には、本実施の形態ではプローブを配置するのに使用したスポット装置を用いて、放射性同位体（ ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 等）を試験片1の表面に配置する。なお、試験片1の形成からハイブリダイゼーションまで時間があるときには、半減期が長い放射性同位体である ^{14}C を用いることが好ましい。また、識別情報を形成する放射性同位体としては、後述するターゲットを標識付けるものと同一であってもよく、これとは異なるがターゲットを標識付ける放射性同位体と同様の放射線を発するものであってもよい。試験片1の表面に配置された放射性同位体の配置状態を図3に示す。図3に示すように、試験片1に関する識別情報はコード化されて、コード化された識別情報が試験片1の表面に配置される。具体的には、試験片1の作成日、作成ナンバー、試験片1の種類、試験片1に配置固定したプローブの種類、プローブの配置形態を表すフォーマットに関する情報等が識別情報とされる。なお、識別情報をコード化する手法は従来公知の種々の方法を使用することができる。

【0032】

コード化された識別情報は、図3（a）に示すようにバーコード状として配置

してもよく、また、図3（b）に示すようにドット状に配置してもよい。この配置された識別情報は、作成日を示す部分と、試験片1の種類を示す部分と、プローブの種類を示す部分とから構成されるが、これらを1つにまとめて1つのコード情報として表してもよい。このように本実施の形態では、試験片1に関する識別情報がコード化されているため、試験片1上の狭いスペースに識別情報を配置することができる。

【0033】

そして、上述した手順によりメンブレン2の表面にプローブを配置した後、紫外線（UV）を照射することによりプローブをメンブレン2に固定化して試験片1を形成する。

【0034】

次に、解析する細胞から抽出したRNAを用いて調整したpoly(A)RNAを鋳型とし、逆転写反応で放射性同位体により標識付けされたcDNAを合成する。この標識されたcDNAをターゲット（検体）とする。

【0035】

なお、ターゲットに関する情報が予め分かっている場合には、これらの情報もコード化して試験片1に配置することが好ましい。

【0036】

そして、調整された溶液の中に試験片1を浸してターゲットをハイブリダイゼーションさせる（図4）。その後、試験片1の表面を洗浄することにより、ハイブリダイゼーションされなかったターゲット6を取り除き、図5に模式的に示すように、ハイブリダイゼーションされた放射性同位体で標識付けられたターゲット8のみを試験片1上に残す。

【0037】

次に、試験片1上に残ったターゲット8の位置を検出するために、試験片1に蓄積性蛍光体シート30を密着させ（図6）、密着後暗所に試験片1と蓄積性蛍光体シート30を密着させた状態で放置して、蓄積性蛍光体シート30に放射性同位体からの放射線を露光する。なお、放射線の露光前に蓄積性蛍光体シート30の全面に可視光を照射し、蓄積性蛍光体シート30に蓄積されていた不要な情

報を消去する。そして、密着後一定時間放置することにより、試験片 1 に残ったターゲット 8 からの放射線エネルギーと、試験片 1 に関する識別情報として図 5 中 20 で示す位置に配置した放射性同位体からの放射線エネルギーを蓄積性蛍光体シート 30 に蓄積させる。

【0038】

ここで、蓄積性蛍光体シートとは、放射線が照射されると、放射線エネルギーを吸収して、蓄積記録し、その後に、特定の波長域のレーザ等を用いて励起すると、照射された放射線のエネルギー量に応じた光量の輝尽発光光を発する特性を有するものをいい、代表的には支持体上に Ba F X（ここで X はハロゲン）蛍光体粒子がバインダ中に高密度に充填されたものが塗布されたものが知られており、輝尽性蛍光体を用いた放射線変換パネルとしても知られている。

【0039】

次に試験片 1 と蓄積性蛍光体シート 30 を分離して、蓄積性蛍光体シート 30 に蓄積された放射線エネルギーを検出する。この動作を、図 7 を用いて簡単に説明すると、ハーフミラーまたはダイクロイックミラー 12 を用いて、読取用レーザ 10 を反射して蓄積性蛍光体シート 30 の表面全域を走査し、蓄積性蛍光体シート 30 で発光した輝尽発光光 14 をミラー 12 を通過させてフォトマルチプライヤ (PMT) により検出する。すなわち、ハイブリダイゼーションの過程で試験片 1 上の cDNA のドット 4 にハイブリダイズされた標識付きのターゲット 8 の標識である放射性同位体からの放射線に曝されて放射線エネルギーを蓄積した箇所と、試験片 1 上に配置固定した試験片 1 に関する情報を示す放射性同位体からの放射線に曝されて放射線エネルギーを蓄積した箇所から輝尽発光光が発光するため、それを PMT により検出することにより放射性同位体の位置が特定できる。PMT で検出した輝尽発光光は電気信号に変換され、コンピュータ C に入力されて、発光位置を示す情報がコンピュータ C に記憶される。

【0040】

ここで、コンピュータ C に記憶された発光位置を示す情報には、図 5 中 20 で示す位置に試験片 1 に関する識別情報が含まれ、この識別情報から試験片 1 に関する情報（本実施の形態では試験片 1 の作成日、メンブレン種、プローブ種、プ

ローブの配置形態を表すフォーマット等の情報)を読み取ることができる。

【0041】

したがって、本実施の形態では、コンピュータCに記憶された発光位置を示す情報を解析する際には、まず図5中20で示す位置に対応する部分の発光位置を示す情報を解析しコード化された情報を読み取る。しかる後この情報から実験に使用された試験片1の作成日、試験片の種類およびプローブの種類等を特定する。このような特定を行った後、研究者がコンピュータCに試験片1に配置固定したcDNAの位置と種類に関する情報を入力し、この情報とコンピュータCに記憶された発光位置を示す情報を比較することにより、細胞から抽出したRNAとハイブリダイゼーションしたcDNAとハイブリダイゼーションしなかったcDNAを特定する。

【0042】

以上、詳述したように、本実施の形態に係る検出システムでは、試験片1に試験片1の管理情報(作成日、試験片の種類、プローブ種等)と対応付けられた識別情報が標識物質(放射性同位体)を用いて付与されるため、蓄積性蛍光体シート30に試験片1の識別情報をも記憶させることができる。したがって、蓄積性蛍光体シートからハイブリダイズした検出体の位置を検出する際に試験片1の識別情報をも同時に検出することができる。

【0043】

また、試験片1に配置する検出体の種類が多くなり実験する試験片1の種類が多くなっても、試験片1から識別情報を読み取れば、検出情報を対応させて取得することができ、これにより試験片1の識別情報と検出情報とが不一致となることを防止することができる。

【0044】

また、試験片1の識別情報を、標識物質と同一またはこれに類似する物質を用いて配置しているため、この識別情報を読み取るために特別な読取装置を必要とせず、かつハイブリダイゼーションした検出体の標識物質の位置を検出する際に試験片1に関する情報を同時に検出することができるため、余分な工程を増やすことなく処理を行うことができる。

【0045】

なお、上記実施の形態では、メンブレン2に放射性同位体を配置する際にスポット装置を使用した。これに代えて、インクジェットプリンタ装置を使用することもできる。この場合には、インクの代わりに放射性同位体をメンブレン2の表面にプリント（配置）することとなる。

【0046】

また、上記実施の形態では、ハイブリダイズ前に試験片1の識別情報を試験片1に配置したが、これに限られず、ハイブリダイズ後に識別情報を配置してもよい。なお、ハイブリダイゼーションの後に放射性同位体を識別情報として配置する場合には、試験片1に配置した放射性同位体を固定する必要がない。これは、ハイブリダイゼーション工程や、その後にハイブリダイズしなかったターゲットを洗い流す際に配置した放射性同位体が剥がれる可能性があるが、その後であれば放射性同位体が剥がれないためである。

【0047】

さらに、上記実施の形態では、ターゲットを標識付けするのに放射性同位体を使用した。蛍光色素（Cy5、Cy3等）を使用することもできる。この場合には、蓄積性蛍光体シートを使用することなく、蛍光色素を励起させるための励起光を試験片1に直接照射し、蛍光色素から発せられる蛍光をPMTにより検出すればよい。

【0048】

また、上記実施の形態では、標識物質と同一またはこれに類似するの物質を用いて試験片1に関する情報を配置しているが、これに限られず、印刷などにより試験片1に関する情報を配置してもよい。また、メンブレン2に凹凸を形成したり、孔を形成する等の手法により試験片1に試験片1に関する情報をコード化して配置してもよい。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施の形態で用いる試験片の一例を示す斜視図

【図2】

試験片の表面にマトリクス状に生体分子が配置固定された状態を模式的に示す斜視図

【図 3】

試験片に配置固定されるコード化された情報の一例を示す図

【図 4】

ハイブリダイゼーション工程を模式的に示す斜視図

【図 5】

ハイブリダイゼーション後の状態を模式的に示す斜視図

【図 6】

試験片に蓄積性蛍光体シートを重ね合わせて蓄積性蛍光体シートを放射線に曝す工程を模式的に示す斜視図

【図 7】

読取用レーザを照射して発光させる様子を模式的に示す斜視図

【図 8】

従来のマイクロアレイの基板を模式的に示す斜視図

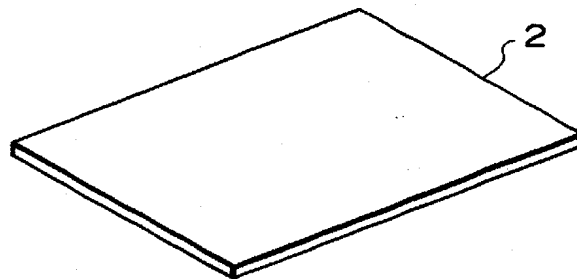
【符号の説明】

- 1 試験片
- 2 メンブレン
- 4 cDNAのマトリクス
- 6 ターゲット
- 10 読取用レーザ
- PMT フォトマルチプライヤ

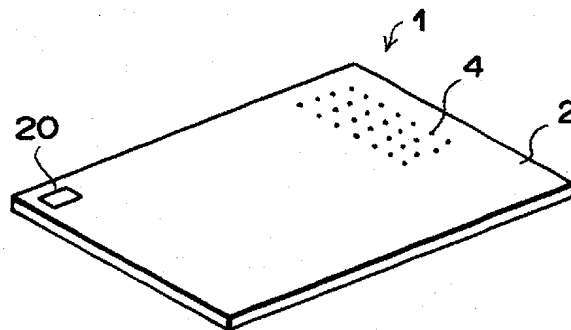
【書類名】

図面

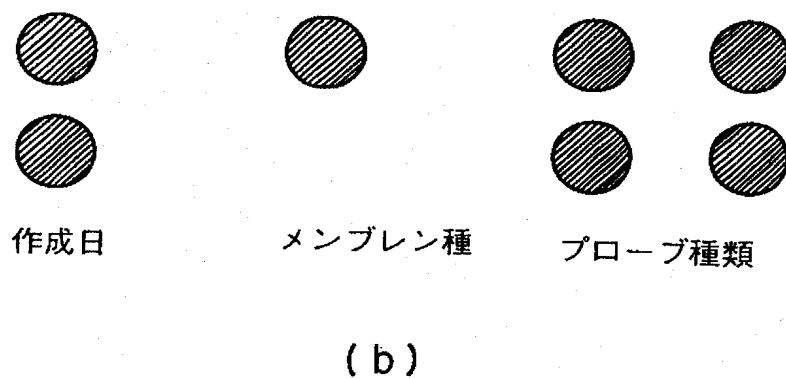
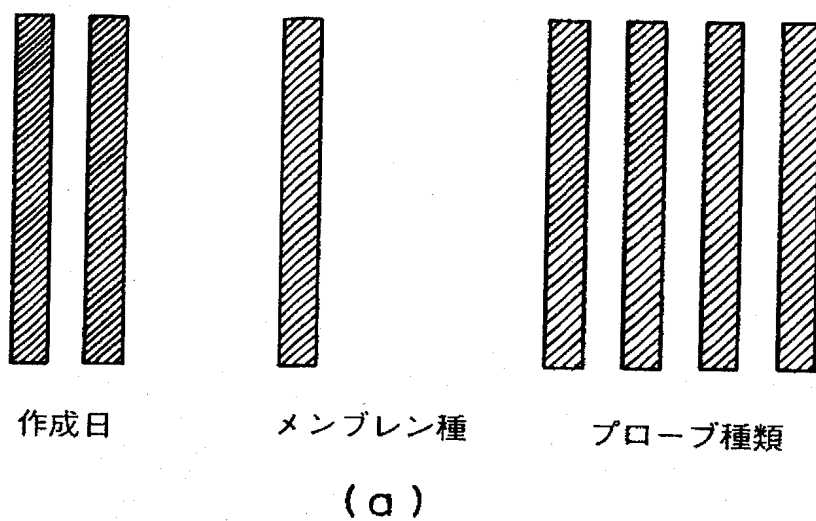
【図 1】



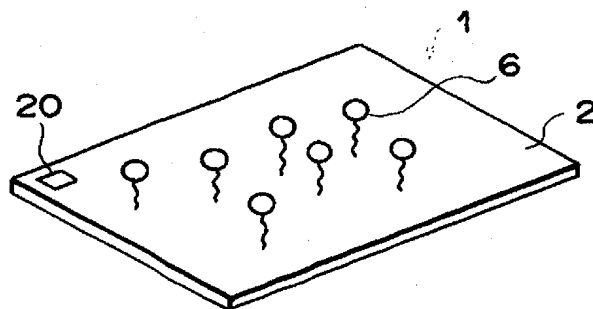
【図 2】



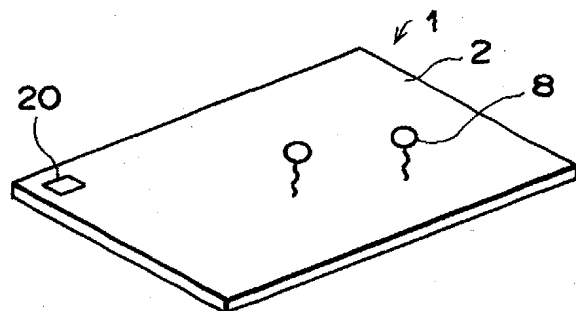
【図3】



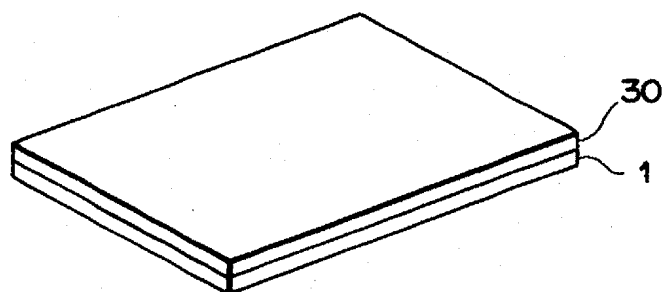
【図4】



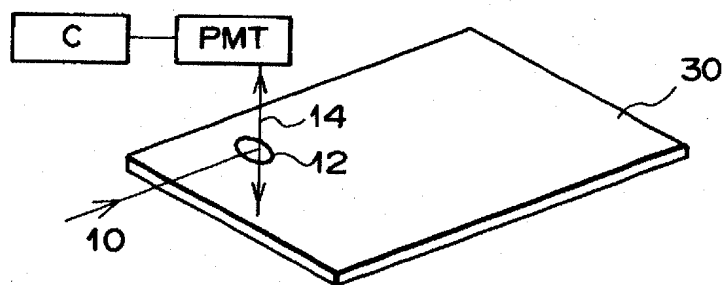
【図5】



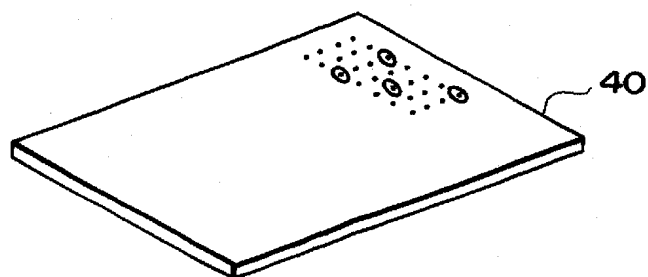
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アレイ状に検出体がプロットされた試験片を用いる遺伝子発現解析において、試験片に関する情報と検出情報との不一致を防止する。

【解決手段】 標識物質で標識付けられた検体と結合する多種類の検出体4が配置固定された試験片1の所定位置20に標識物質を用いて試験片1に関する識別情報を付与する。

【選択図】 図2

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第372925号
受付番号	59901280179
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年 1月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年12月28日
【特許出願人】	
【識別番号】	000005201
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼210番地
【氏名又は名称】	富士写真フイルム株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100073184
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3-18-20 B ENEX S-1 7階 柳田国際特許事務所
【氏名又は名称】	柳田 征史
【選任した代理人】	
【識別番号】	100090468
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3-18-20 B ENEX S-1 7階 柳田国際特許事務所
【氏名又は名称】	佐久間 剛

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名	富士写真フイルム株式会社